

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 21720081152622

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

\_\_\_\_\_ 硕 士 \_\_\_\_\_ 学 位 论 文

# 对虾白斑综合症病毒(WSSV)极早期基因启动 子的研究

## Research on three promoters of the Immediate Early Genes of White Spot Syndrome Virus(WSSV)

黄 河

指导教师姓名: 杨 丰 研究员

李 钊 副研究员

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2011 年 04 月

论文答辩时间: 2011 年 05 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2011 年 06 月

# 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。  
本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中  
以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规  
范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,  
获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在  
( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课  
题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。

声明人(签名):

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于  
年    月    日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年    月    日

# 目 录

|                                   |     |
|-----------------------------------|-----|
| 摘 要                               | III |
| Abstract                          | VI  |
| 前 言                               | 1   |
| 1. 对虾养殖及其病害                       | 1   |
| 1.1 国际对虾养殖概况                      | 1   |
| 1.2 我国对虾养殖业概况                     | 1   |
| 1.3 对虾病害概况                        | 2   |
| 2. 对虾白斑综合症病毒的研究概况                 | 3   |
| 2.1 对虾白斑综合症病毒的发现                  | 3   |
| 2.2 对虾白斑综合症病毒的命名                  | 4   |
| 2.3 对虾白斑综合症症状和组织病理学特征             | 5   |
| 2.4 对虾白斑综合症病毒的宿主和传播途径             | 6   |
| 2.5 对虾白斑综合症病毒的生活周期                | 7   |
| 2.6 对虾白斑综合症病毒的形态结构                | 8   |
| 3. 对虾白斑综合症病毒（WSSV）基因组学研究概况        | 9   |
| 3.1 WSSV 全基因组序列的测定                | 9   |
| 3.2 对虾白斑综合症病毒基因组的转录和调控            | 14  |
| 4. 对虾白斑综合症病毒蛋白的功能研究               | 16  |
| 4.1 对虾白斑综合症病毒主要结构蛋白               | 16  |
| 4.2 对虾白斑综合症病毒 DNA 复制相关酶类的研究       | 20  |
| 4.3 泛素化相关蛋白的研究                    | 22  |
| 5. DNA 病毒极早期基因简介以及 WSSV 极早期基因研究现状 | 23  |
| 5.1 DNA 病毒极早期基因的定义                | 23  |
| 5.2 DNA 病毒极早期蛋白的功能                | 23  |
| 5.3 WSSV 极早期基因和极早期蛋白研究现状          | 24  |
| 6. 本论文的研究内容与意义                    | 26  |
| 第一部分 对虾白斑综合症病毒极早期基因启动子的研究         | 28  |
| 1. 前言                             | 28  |

|   |    |
|---|----|
| 2. 材料与方法-----   | 28 |
| 2.1 材料 -----  | 28 |
| 2.2 主要仪器 -----  | 29 |
| 2.3 常用溶液和培养基的配置 -----                                     | 30 |
| 2.4 方法 -----  | 31 |
| 3. 结果与分析-----   | 39 |
| 3.1 5' RACE (rapid amplification of the cDNA end) 结果----- | 41 |
| 3.2 极早期基因启动子活性区域分析-----                                   | 50 |
| 4. 讨论 -----   | 63 |
| 第二部分 对虾白斑综合症病毒 (WSSV) 极早期蛋白 WSV249 的融合<br>表达 -----        | 69 |
| 1. 前言-----  | 69 |
| 1.1 DNA 病毒极早期蛋白的功能-----                                   | 69 |
| 1.2 细胞内的泛素化-----  | 69 |
| 1.3 WSSV 病毒极早期蛋白 WSV249 研究现状-----                         | 70 |
| 2. 材料与方法-----   | 70 |
| 2.1 材料 -----  | 70 |
| 2.2 主要仪器 -----  | 71 |
| 2.3 实验方法-----   | 71 |
| 3. 结果与分析-----   | 75 |
| 3.1 软件预测极早期蛋白 WSV249 结构 -----                             | 75 |
| 3.2 极早期蛋白 WSV249 的分段融合表达-----                             | 76 |
| 3.3 WSV 249 在各类真核细胞中的融合表达 -----                           | 79 |
| 4. 讨论-----  | 81 |
| 小结 -----  | 84 |
| 展望 -----  | 85 |
| 参考文献 -----  | 86 |
| 致谢 -----  | 98 |

## CONTENTS

|  |            |
|--|------------|
| <b>Chinese abstract</b>  | <b>III</b> |
| <b>English Abstract</b>  | <b>VI</b>  |
| <b>Introduction</b>  | <b>1</b>   |
| 1. Shrimp culture current status and disease                                       | 1          |
| 1.1 International shrimp culture current   | 1          |
| 1.2 Shrimp culture current status in China   | 1          |
| 1.3 The disease of shrimp  | 2          |
| 2. Overview of white spot syndrome virus   | 3          |
| 2.1 Finding of white spot syndrome virus   | 3          |
| 2.2 Naming of white spot syndrome virus  | 4          |
| 2.3 Symptom of white spot syndrome virus   | 5          |
| 2.4 Host and Propagation path of white spot syndrome virus                         | 6          |
| 2.5 Life cycle of white spot syndrome virus  | 7          |
| 2.6 Size and structure of white spot syndrome virus                                | 8          |
| 3. Genomics research of white spot syndrome virus                                  | 9          |
| 3.1 Sequencing of WSSV genomics  | 9          |
| 3.2 Transcription and regulation of WSSV   | 14         |
| 4. Proteomics research of white spot syndrome virus                                | 16         |
| 4.1 Main structural proteins of white spot syndrome virus                          | 16         |
| 4.2 Enzymes involving in DNA duplication of WSSV                                   | 20         |
| 4.3 Proteins involving ubiquitination of WSSV                                      | 22         |
| 5. Introduction of DNA virus immediate-early(IE) genes and current research status | 23         |
| 5.1 Definition of DNA virus immediate-early(IE) genes                              | 23         |
| 5.2 Function of immediate-early(IE) proteins                                       | 23         |
| 5.3 The immediate-early(IE)genes and proteins research status                      | 24         |
| 6. Contents, purpose and significance of thesis                                    | 26         |
| <b>Part I Research on three promoters of IE genes of WSSV</b>                      | <b>28</b>  |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Introduction</b>                                    | <b>28</b> |
| <b>2. Materials and methods</b>                           | <b>28</b> |
| 2.1 Materials   | 28        |
| 2.2 Main apparatus  | 29        |
| 2.3 The preparation of common solutions and medium        | 30        |
| 2.4 Methods   | 31        |
| <b>3. Results and analysis</b>                            | <b>39</b> |
| 3.1 5' RACE (rapid amplification of the cDNA end) results | 41        |
| 3.2 Analysis of three promoters of IE genes               | 50        |
| <b>4. Discussion</b>                                      | <b>63</b> |
| <b>Part II Research on IE protein WSV249 of WSSV</b>      | <b>69</b> |
| <b>1. Introduction</b>                                    | <b>69</b> |
| 1.1 Function of immediate-early(IE) proteins              | 69        |
| 1.2 Ubiquitination in the cell                            | 69        |
| 1.3 IE protein WSV249 current research status             | 70        |
| <b>2. Materials and methods</b>                           | <b>70</b> |
| 2.1 Materials   | 70        |
| 2.2 Main apparatus  | 71        |
| 2.3 Methods   | 71        |
| <b>3. Results and analysis</b>                            | <b>75</b> |
| 3.1 Forecasting the construction of WSV249                | 75        |
| 3.2 The section fused protein expression of WSV249        | 76        |
| 3.3 WSV 249 fusion expression in eukaryocyte              | 79        |
| <b>4. Discussion</b>                                      | <b>81</b> |
| <b>Summary</b>  | <b>84</b> |
| <b>Perspect</b>   | <b>85</b> |
| <b>References</b>   | <b>86</b> |
| <b>Acknowledge</b>  | <b>98</b> |

## 摘 要

对虾白斑综合症病毒(WSSV)是困扰对虾养殖业最主要的病原体, 目前人们对它的侵染机制还不完全的了解。与其他 DNA 病毒相似, WSSV 的基因转录通常具有时相性的特征, 根据转录时间的不同可以细分为极早期基因、早期基因、晚期基因。本研究选出其中三个极早期基因 *wsv051*, *wsv056*, *wsv083* 进行研究, 5' RACE 实验具体找到这三个极早期基因的起始转录位点, 发现 *wsv051* 的起始转录位点位于 ATG 上游 366nt 处, *wsv056* 的起始转录位点位于 ATG 上游 227nt 处, *wsv083* 的起始转录位点位于 ATG 上游 113nt 处。*wsv051*, *wsv083* 的起始转录位点位于预测的 TATA box 下游 23nt 处, *wsv056* 可能不受 TATA box 调控影响。将这三个极早期基因的 ATG 上游约 600bp 的启动子序列单独克隆至缺少启动子序列的 pIZΔIE/EGFP 质粒中, 使得 GFP 报告基因的转录在 WSSV 极早期基因启动子的调控之下, 并转染至昆虫细胞 High Five 细胞系中。再通过一系列的启动子的缺失突变, 用流式细胞仪定量 GFP 报告基因的强度寻找出这三个启动子的最强活性区域。此外, 还找出 *wsv083* 启动子中一段 92bp 的重要序列, 此段序列的有望用于构建表达载体的启动子序列。

**关键词:** 对虾白斑综合症病毒 (WSSV); 极早期基因; 启动子



## Abstract

White Spot syndrome virus (WSSV) is currently the major viral pathogen of aquacultured shrimps that causes huge economic losses to shrimp farming industries worldwide. However, the mechanism of WSSV infection is not fully understood. Like most dsDNA virus, WSSV transcribes its genes in a temporal manner, which is classified into three stages: immediate-early (IE), early, and late. This study is focus on the three immediate early genes: *wsv051*, *wsv056*, *wsv083*. Analysis of these three gene 5' RACE (rapid amplification of the cDNA end) products cloned in PMD-18T Simple vector revealed that the ranscription initial site (TIS) of *wsv051* was located 366nt upstream of the putative ATG initiation codon, while the TIS of *wsv056* and *wsv083* were located 227nt and 113nt upstream of ATG initiation codon respectively. The TIS of *wsv051* and *wsv083* were located 23nt downstream of the putative TATA box, while the ranscription of *wsv056* gene perhaps unaffected by the TATA box. The 600bp promoter sequence of these there immediate early genes were cloned into the pIZΔIE / EGFP plasmid ,which lack of the promoter sequence ,then these clones were transfected into High Five cell lines. In High Five cells, the translation of GFP reporter gene was under the control of WSSV immediate early genes' promoters. Then by means of a series of promoter deletion mutants, and use the flow cytometry to determine the strength of the GFP, we found the strongest and smallest promoters regions of these three immediate early genes. In addition, we found a 92bp sequence which from promoter of *wsv083* is important for the expression of GFP. So the 92bp sequence is prospective for the vector construction.

**Key words:** white spot syndrome virus (WSSV); immediate early gene; promoter

## 前 言

### 1. 对虾养殖及其病害

#### 1.1 国际对虾养殖概况

由于世界对虾三大消费市场美国、日本和西欧对虾供不应求，而海洋生物捕捞过渡以及受海况等自然条件的制约，单凭对虾捕捞业已不可能满足市场需求，对虾养殖业便应运而生。另一方面，由于对虾养殖业在对虾养殖的国家（主要是亚洲和南美洲发展中国家）国民经济发展中的突出贡献，政府持鼓励态度，同时养殖对虾的出口贸易所带来的巨额利润也驱使更多的投资者投资到对虾养殖业中，使对虾养殖业得到迅速发展。1984 年，世界对虾养殖产量仅占对虾总产量的 20%，而到 1999 年却达到总产量的 50%。目前，虾类的消费主要集中在美国、欧盟、日本等生活水平较高的国家和地区，消费量约占世界虾类产销量的 75%，而主要虾类生产国，包括海洋捕捞和人工养殖对虾却主要分布在东半球的东南部。2004 年全世界虾类产量  $607.9 \times 10^4 \text{ t}$ ，全球最大虾类生产国依次为中国、泰国、印尼、越南等，而西半球国家只有拉丁美洲厄瓜多尔居于主要产虾国的第十位<sup>[1]</sup>。联合国粮农组织（FAO）资料显示，在总量为 420 万吨的虾类产品出口额中虾类出口额占近 18%。近几十年来，世界各国的对虾养殖业发展迅猛，为全球粮食安全、食物供给、经济增长、国际贸易平衡、就业和扶贫等做出了巨大的贡献。

对虾养殖起源于亚洲，亚洲也一直是对虾养殖的主产区，随着全球化进程的不断加快，许多南美国家基于本国的资源比较优势，大力发展对虾养殖业，特别是凡纳滨对虾（*Litopenaeus vannamei*）的人工养殖，目前亚洲的总产量仍然占世界对虾养殖产量的 80%以上<sup>[2,3]</sup>

#### 1.2 我国对虾养殖业概况

我国对虾养殖有很长的历史，但是真正为人们重视，迅速发展成为一种产业只有四十多年的历史。我国对虾规模化养殖始于八十年代初期，经过近三十年的不断发展，我国目前的对虾产量已位居世界第一。2007 年对虾养殖总产量达到 126 万吨，约占世界养殖总产量的 37%，在中国出口水产品市场上占有重要的位置。我国对虾养殖发展可分为三个阶段<sup>[1]</sup>

（1）对虾养殖兴起、发展阶段：20 世纪 70 年代中国明对虾养南移成功，为大面积养殖创造了条件，到 1982 年，全国沿海 10 个省、市、区发展对虾养殖。从

1983 年到 1987 年, 对虾养殖业发展更快, 1987 年突破斑节对虾人工育苗技术后, 斑节对虾养殖在我国福建以南各省沿海迅速发展起来, 对虾养殖面积  $19.71 \times 10^4 \text{hm}^2$ , 产量达到  $15.33 \times 10^4 \text{t}$ ; 到了 1991 年和 1992 年, 产量分别达到  $21.96 \times 10^4$  和  $20.69 \times 10^4 \text{t}$ , 跃居世界养虾之首。

(2) 对虾养殖的滑坡和恢复阶段: 1992 年首先在福建沿海发生养殖对虾病毒病, 1993 年蔓延至全国沿海, 造成了巨大的经济损失, 给养虾业带来了沉重的打击, 特别是中国明对虾打击最大, 至今未能恢复元气。由于经历了灾难性瘟疫, 对虾的病害防治引起了人们的重视, 不断研究防治措施和提高养虾技术, 特别是 1998 年凡纳滨对虾在广东省的深圳, 汕头, 湛江等地养殖成功后, 主产区移至华南; 全国产量开始缓慢恢复到历史水平。

(3) 对虾养殖大发展阶段: 凡纳滨对虾迅猛增长, 全国产量飙升, 主产区在华南; 2003 年分种类统计, 凡纳滨对虾即超过 60 万吨; 目前凡纳滨对虾年产量已超过 100 万吨, 比例超过 80%。

凡纳滨对虾又名南美白对虾, 学名 *Litopenaeus vannamei*, 在分类学上隶属于节肢动物门 (*Arthropoda*)、甲壳纲 (*Crustacea*)、十足目 (*Decapoda*)、游泳亚目 (*Natantia*)、对虾科 (*Penaeidae*)、滨对虾属 (*Litopenaeus*), 是少数几种具有开放式纳精囊的对虾种类<sup>[3]</sup>。

### 1.3 对虾病害概况

对虾养殖业在发展迅速的同时, 也造成了对虾养殖环境的恶化, 种质资源退化, 疾病滋生等一系列问题<sup>[3]</sup>。1993 年至 1994 年, 由于对虾病毒性疾病的爆发, 对虾养殖业步入了低谷, 养殖对虾总量急剧下降。从 1993 年的 8.7 万吨下降到 1994 年的 5.5 万吨, 经济损失达到数十亿。对虾的病害特别是病毒流行病是目前困扰我国对虾养殖业生存和发展最突出的问题。已报道的对虾疾病种类数十种, 病原种类包括病毒、细菌类、真菌类、寄生虫类、原生动物类。目前中国、瑞典、日本、台湾和新加坡的一些研究机构已经进行了虾病毒的病原、病理、传播途径及快速诊断方法的研究, 并且取得了一定的进展, 但还没有最终研究出有效的预防和治疗方法。

人工养殖对虾的疾病主要由细菌和病毒引起。虽然细菌病可用抗生素控制, 但大量使用抗生素, 不仅可导致细菌产生抗药性, 而且还可抑制对虾自身免疫力的发挥。同时, 对病毒病目前尚无特殊治疗方法。故国内外治疗对虾病普遍采用的方法

是“以防为主”，其根本目的是通过提高对虾自身免疫能力以增强其抗病力。因此研究甲壳类动物的免疫机制，有效的提高虾类本身的抗病能力，是解决病害问题的一条非常有效的途径。自 60 年代以来，瑞典，美国，日本等国的学者发表了大量的论文集专著，对甲壳动物免疫机制等问题进行了有益的探索。而在影响对虾养殖业的众多病害中，对虾白斑综合症病毒（white spot syndrome virus, WSSV）至今仍旧是对虾养殖业最大的威胁<sup>[1,4]</sup>。

## 2. 对虾白斑综合症病毒的研究概况

对虾白斑综合症病毒（white spot syndrome virus, WSSV）是引起对虾白斑综合症的病原体,是一种有囊膜的双链环状 DNA 病毒，属于 Whispovirus 属，并且是 Nimaviridae 新科中目前唯一的成员<sup>[5]</sup>。WSSV 宿主范围很广<sup>[6-9]</sup>，传染力强，致死率高，是目前已测序的最大的动物病毒之一。负染色电镜观察下，WSSV 的病毒体末端具有尾状附器（tail-like appendage）。完整的病毒粒子大小为（110~130）nm×（260~350）nm<sup>[10]</sup>，生物信息学分析，预测该病毒约有 180 个开放阅读框（open reading frames, ORFs），但是大多数 ORFs 编码的蛋白和数据库中的蛋白几乎没有同源性，即便是与在形态上很相似的昆虫杆状病毒。仅有少数基因与其他病毒或生物的已知蛋白或结构域有较高的同源性，大部分是一些与核苷酸代谢和 DNA 复制有关的酶类<sup>[7]</sup>。

自上世纪九十年代首次爆发以来，WSSV 病毒给全球对虾养殖业造成了巨大的损失，是目前困扰对虾养殖业最主要的病害。为了寻求防治对虾白斑病的方法，研究人员对 WSSV 展开了逐步深入的研究。早期的工作主要集中在病原学、病理学、流行病学等方面，研究人员还建立了一些实用的病原体检测方法，用于病害的检测和预防。2001-2002 年三株 WSSV 病毒基因组序列的测定拉开了 WSSV 分子病毒学研究的序幕，在此基础上，针对该病毒结构蛋白的研究取得了实质性的进展。此外一些与 DNA 复制相关的酶类基因，以及一些与泛素化过程有关的蛋白等也陆续被鉴定。虽然目前针对 WSSV 的分子生物学研究取得了一定的进展，但是最主要还是集中于病毒结构蛋白方面，对 WSSV 感染机制的特别是病毒的调控机制，病毒与宿主的相互作用等仍缺乏了解,对该病毒病的防治尚缺乏有效的方法。

### 2.1 对虾白斑综合症病毒的发现

对虾白斑综合症病毒在 1992-1993 年在福建沿海首次出现，在我国南部，引发

了一种新的对虾爆发性疾病，造成了养殖对虾的大规模死亡。1993 年春，日本养殖对虾大量发生白斑综合症而死亡；同年 5-8 月，中国沿海从南到北的对虾养殖场大面积暴发白斑综合症，虾池大部分绝产；1994 年底泰国南部、印度、马来西亚的养殖对虾死于该病。随后，白斑综合症传遍亚洲和印度太平洋地区的绝大多数对虾养殖场。1995 年 10 月份，西半球报道了第一例对虾白斑综合症。在此后的十几年时间内该病毒给全球对虾养殖业造成了严重的打击。染病晚期的对虾头胸甲部可见大量的白斑（图 1），因此这种疾病被称为对虾白斑综合症<sup>[11]</sup>。



图 1：白斑病毒感染的对虾头部甲壳呈现的白斑<sup>[11]</sup>

表 1：白斑病毒爆发的时间和地点<sup>[11]</sup>

| Year first reported | Country  | Reference   |
|---------------------|--|---|
| 1992                | Taiwan   | Chou <i>et al.</i> 1995   |
| 1993                | China, Japan, Korea  | Zhan <i>et al.</i> 1998; Inouye <i>et al.</i> 1994; Park <i>et al.</i> 1998 |
| 1994                | Thailand, India, Bangladesh  | Lo <i>et al.</i> 1996a.   |
| 1995                | USA  | Lightner 1996; Wang <i>et al.</i> 1999a                                     |
| 1996                | Indonesia, Malaysia, Sri Lanka   | Durand <i>et al.</i> 1996   |
| 1997                | Vietnam  | Bondad-Reantaso <i>et al.</i> 2001  |
| 1998                | Penu   | Rosenberry 2001   |
| 1999                | Philippines, Ecuador, Colombia, Panama, Honduras, Nicaragua, Guatemala, Belize | Mabanua <i>et al.</i> 2000; Bondad-Reantaso <i>et al.</i> 2001              |
| 1999-2000           | Mexico   | Bondad-Reantaso <i>et al.</i> 2001  |
| 2002                | France, Iran   | Dieu <i>et al.</i> 2004; Marks 2005   |
| 2005                | Brazil   | APHIS-USDA 2005   |

## 2.2 对虾白斑综合症病毒的命名

自从对虾白斑综合症出现以来，各地研究人员相继纯化分离了其病原体，其是一种新型的非包涵体型杆状病毒，但根据所分离病毒株的地域分布、原始宿主、形态发生以及主要病理症状，给不同分离株赋予了不同的名称，见表 2。Wang<sup>[12]</sup>等用 PCR

技术比较研究了不同分离株的对虾白斑病毒 DNA，发现 PCR 产物只有少许差别。根据以上研究结果，可以看出各地发现的白斑综合症病毒差异很小，应为同一种新型病毒。Lightner<sup>[13]</sup>等建议将这类杆状病毒统一命名为对虾白斑综合症病毒(White spot syndrome virus, WSSV)。

表 2：各地报道的对虾白斑病毒的命名

| 缩写(Abbreviation) | 英文全称(Full name)                                      |
|------------------|--|
| LNBV             | Lymphoid cell nuclear baculovirus                    |
| RV-PJ            | Rod-shaped nuclear virus of <i>Penaeus japonicus</i> |
| HHNBV            | Hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus    |
| NOSV             | Non-occluded shrimp virus                            |
| PcBLV            | <i>Penaeus chinensis</i> baculo-Like virus           |
| SEMBV            | Systemic ectodermal and mesodermal baculovirus       |
| PmNOB II         | <i>Paeneis monodon</i> non-occluded baculovirus II   |
| MBV              | <i>Penaeus monodon</i> type baculovirus              |
| PRDV             | Penaeid rod-shaped DNA virus                         |
| PAV              | Penaeid acute viremia                                |
| CBV              | Chinese baculovirus                                  |
| PCBV             | <i>Penaeus chinensis</i> baculovirus                 |
| WSBV             | White spot syndrome baculovirus                      |
| WSDV             | White spot disease virus                             |
| WSV              | White spot virus                                     |
| WSSV             | White spot syndrome virus                            |

### 2.3 对虾白斑综合症症状和组织病理学特征

对虾感染 WSSV 后，病虾的表现主要有三个阶段：在感染 WSSV 的早期，染病虾首先出现昏睡、减少觅食等症状；继而完全停止觅食，时时浮到水面，行动迟缓失去平衡；最后阶段病虾对外界刺激反应阶段，大多虾虾体微红，腹节肌肉略白，发生细胞解体以及器官坏死，病虾死亡。感染的对虾在甲壳上会出现白色的斑点，这种斑点是异常的钙沉积，在头胸甲上尤为明显，是对虾白斑综合症的典型特征<sup>[15]</sup>，患病对虾体内氨基酸、脂类、糖类等基础物质代谢紊乱，而且其免疫机能也明显衰

退<sup>[15,16,17]</sup>。

WSSV 可以广泛的侵染对虾的外胚层以及中胚层组织,组织病理学研究发现,在病虾的鳃组织、胃和肠上皮细胞及粘膜下层结缔组织、淋巴器官、触角腺、心脏、肝胰腺及肌肉等组织器官中都发生了不同程度的病变。上皮组织和造血组织是病毒侵染的主要部位,其中对虾甲壳下表皮的细胞和胃的上皮细胞最易感染病毒,鳃的上皮细胞、中肠的结缔组织及其它部位的结缔组织对 WSSV 敏感程度仅次于上述组织<sup>[18-21]</sup>。

电镜分析表明,在感染前期,病变组织细胞核膨胀,核仁消失,核外膜破损,染色质靠核的边缘分布,内质网断裂,核糖体从内质网脱落,线粒体肿胀,高尔基体萎缩,溶酶体空泡化;感染中期,病毒粒子在细胞核内大量复制,直至充满整个核,细胞核核膜及质膜皱缩;感染后期,核膜破裂,病毒粒子从核内释放,细胞核呈空囊状,胞质内髓样结构明显,细胞器解体,细胞功能丧失<sup>[18,19]</sup>。

## 2.4 对虾白斑综合症病毒的宿主和传播途径

WSSV 主要感染甲壳纲十足目的动物,以虾类为主,几乎所有的对虾都能够被 WSSV 感染,如:斑节对虾(草虾)(*Penaeus monodon*)、日本对虾(*P. japonicus*)、刀额新对虾(砂虾)(*Metapenaeus ensis*)、中国对虾(*P. chinensis*)、印度对虾(*P. indicus*)、墨吉对虾(*P. merguensis*)、长毛对虾(*P. penicillatus*)、熊对虾(*P. semisulcatus*)、美国蓝对虾(*P. setiferus*)等<sup>[9]</sup>。此外 WSSV 还感染其它生活在海水、淡水,以及半咸水的甲壳动物,例如螯虾、蟹、龙虾、寄居蟹;以及轮虫、箭虫、多毛虫、甚至一些水生昆虫<sup>[6,9,22,23]</sup>。但其中一些动物虽然实验条件下可以检测出病毒的存在,但是并不支持病毒的增殖,说明其不是病毒的天然感染宿主,而只是病毒的携带者或者称其为 WSSV 感染对虾的中间宿主。虾蟹类的迁徙能力极强,它们广泛存在于自然水体和水产养殖区,特别是对虾养殖水体中,并随着海水流动或者通过自身迁徙的习性而在不同的水体间活动,或被其他大型生物掠食,或死亡后腐烂尸体被对虾等直接感染宿主摄食造成野生虾或养殖虾的感染和死亡。

在天然条件下, WSSV 可以通过污染的水、排泄物,以及病虾残体等,借助取食,鳃的呼吸和体表部位的接触等途径来进行水平传播;在实验室条件下通过灌食或者注射途径都可以使虾感染该病毒; WSSV 还可以通过垂直传播来感染子代<sup>[24]</sup>。从目前的数据来看,白斑综合症的发生不仅与病原体的存在有关,而且受环境压力、

宿主动物的密度、感染的程度等条件的影响。相对野生环境而言,养殖场里的对虾养殖密度很大,面临的环境压力大,一旦出现 WSSV 的感染很容易就形成爆发之势,难以控制。

## 2.5 对虾白斑综合症病毒的生活周期

目前对 WSSV 的生活周期的认识还不完善,已有的认识主要集中在新病毒颗粒生成的部分。WSSV 的复制和组装是在宿主细胞核进行的,活体感染实验表明病毒通常在感染 24 小时内完成一个生命周期。WSSV 的形态发生大致包括了以下几个阶段<sup>[15,24]</sup>:

(1) 在病毒感染的早期,感染细胞的细胞核出现轻微的肥大,由病毒的蛋白形成的纤维状结构组成的病毒核小体出现。细胞的内质网膨大,出现许多游离的核糖体。

(2) 细胞核内的纤维状物质介导了病毒膜结构的形成,病毒的核心物质被包裹到膜结构中,这时在病毒来源的基质和边聚的染色质之间出现了 Crowdry A 氏包涵体。细胞核膨大,变圆。

(3) 病毒核衣壳逐渐由一端到另一端生成,同时囊膜逐步包裹核衣壳。此时细胞内的 Crowdry A 氏包涵体变小,边聚染色质消失,核膜破裂,细胞器出现异常。

(4) 病毒核衣壳完成组装,随后核衣壳被囊膜完全包裹。

(5) 病毒粒子呈卵圆形、形成尾状结构,此时病毒的核衣壳在 DNA 与 VP15 的包装作用下被压缩变短。

(6) 成熟的病毒颗粒呈椭圆形,外有封闭的囊膜及尾状结构,内含成熟核衣壳。在有些情况下病毒的核衣壳形成是单独进行的,在最后的阶段再统一由囊膜进行包裹。在病毒感染的最后阶段,细胞破裂,释放成熟子代病毒颗粒。

根据已有的数据,研究者对 WSSV 可能的生活周期进行了推测,绘制了 WSSV 复制周期的示意图,但是有其中关 WSSV 是如何进入细胞,并被运送到细胞核的过程实际上并不清楚(图 2)。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库